

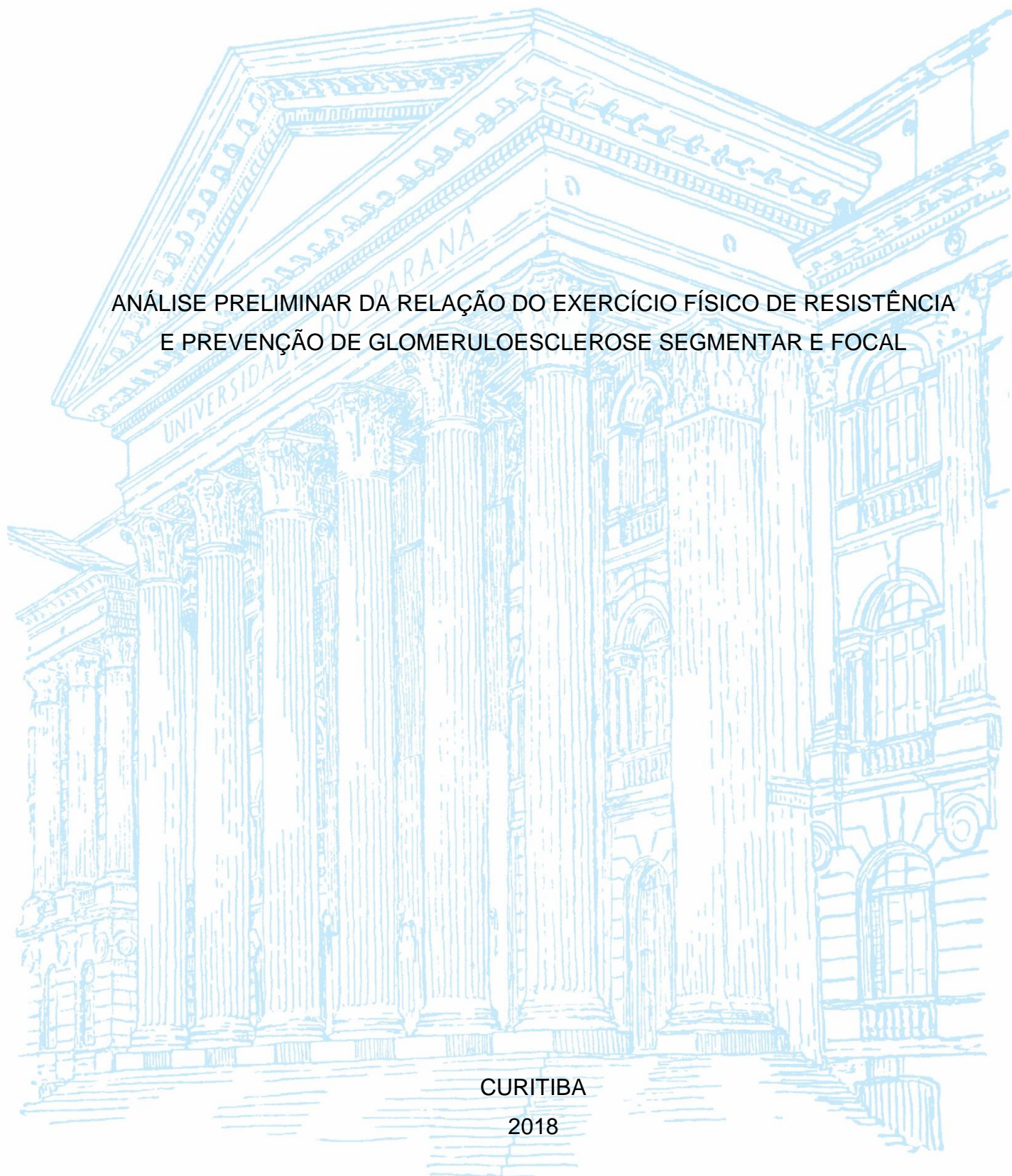
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GABRIEL PEREIRA

ANÁLISE PRELIMINAR DA RELAÇÃO DO EXERCÍCIO FÍSICO DE RESISTÊNCIA
E PREVENÇÃO DE GLOMERULOESCLEROSE SEGMENTAR E FOCAL

CURITIBA

2018



GABRIEL PEREIRA

ANÁLISE PRELIMINAR DA RELAÇÃO DO EXERCÍCIO FÍSICO DE RESISTÊNCIA
E PREVENÇÃO DE GLOMERULOESCLEROSE SEGMENTAR E FOCAL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Luiz Pereira
Coorientadora: Profa. Dra. Anna Gabrielle Gomes Coutinho

CURITIBA

2018

RESUMO

Os números de pacientes com Doença renal crônica (DRC) têm crescido mundialmente. Diversas doenças podem levar a um quadro de DRC, incluindo doenças que afetam sistemicamente o paciente, como obesidade e diabetes, e doenças ligadas diretamente aos rins, como glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF). Sua prevalência tem aumentado, gerando também um maior número de pacientes sobre tratamento dialítico. No Brasil, maior parte dos pacientes em diálise tem seu tratamento custeado inteiramente pelo SUS, tornando a doença um problema de saúde pública devido ao elevado custo de tratamento e sua morbidade e mortalidade. A GESF causa um quadro de inflamação crônica, que está relacionado com a progressão da lesão e fibrose encontrados na doença. Como sabido, a prática de exercício físico pode modular os níveis de citocinas e outros componentes envolvidos na resposta inflamatória. Estudos tem indicado o exercício físico como uma alternativa terapêutica para doenças crônicas, incluindo a DRC. Para avaliar os efeitos do exercício físico regular e moderado em um modelo de GESF induzido por Adriamicina (ADM), nós estimamos os níveis de proteinúria e perda de peso de animais submetidos a um modelo de exercício físico de resistência. Encontramos maiores níveis de albumina presente na urina dos animais do grupo sedentário comparado ao grupo exercício no período de 14 dias após a administração de ADM, não sendo observado um resultado significativo para este marcador no período de 21 dias após a administração de ADM. Apesar da proteinúria induzida pela ADM, mais estudos precisam ser feitos para avaliar os efeitos modulatórios do exercício físico de resistência moderado sobre a progressão da doença.

Palavras-chave: Glomeruloesclerose Segmentar e Focal. Adriamicina. Albuminúria. Exercício físico de resistência.

ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) has a highly incidence worldwide. Many conditions can lead to CDK, including systemic diseases as obesity and diabetes, or direct-linked kidney diseases as Focal and Segmental Glomeruloesclerosis (FSGS). FSGS prevalence continues to rise, causing which in turn rise the numbers of patients in dialysis treatment. Brazilian's dialysis costs are mostly covered by the national public health care program, *SUS*, leading to a public health problem. FSGS causes a systemic chronic inflammation which has been related with the progression of the disease. As known, physical exercise can regulate levels of cytokines that leads to inflammatory response. Studies have been proposing physical exercise as a therapeutic intervention in chronic diseases, including CDK. To evaluate the effects of regular resistance physical exercise in a model of Adriamycin-induced FSGS, we estimated the proteinuria and weight loss of animals submitted to a model of resistance exercise. We found higher levels of albuminuria 14 days after Adriamycin-injection between exercise and sedentary groups, with no significant results in analysis of proteinuria 21 days after Adriamycin-injection between sedentary and exercise groups. Beside the Adriamycin induced nephropathy resulted in proteinuria, more studies are needed to understand the effect of regular moderated physical exercise in the progression of the disease.

Key-words: Focal and Segmental Glomeruloesclerosis. Adriamycin. Albuminuria. Resistance training.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA BARREIRA DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR	8
FIGURA 2 - PATOGÊNESE DA GESF	10
FIGURA 3 – PROTOCOLO DE EXERCÍCIO FÍSICO DE RESISTÊNCIA.....	15
FIGURA 4 – VARIAÇÃO DO PESO CORPORAL DOS ANIMAIS NO PERÍODO DE 14 DIAS APÓS ADMINISTRAÇÃO DE ADM.	19
FIGURA 5 – VARIAÇÃO DO PESO CORPORAL DOS ANIMAIS NO PERÍODO DE 21 DIAS.....	20
FIGURA 6 - VARIAÇÃO DO PESO CORPORAL DOS ANIMAIS APÓS ADMINISTRAÇÃO DE ADM.	21
FIGURA 7 – AVALIAÇÃO DA ALBUMINÚRIA NO PERÍODO DE 14 DIAS.	22
FIGURA 8 – AVALIAÇÃO DO QUADRO DE ALBUMINÚRIA NO PERÍODO DE 21 DIAS.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

DRC - Doença renal crônica

DRCT - Doença renal crônica terminal

GESF - Glomeruloesclerose segmentar e focal

IL - Interleucina

EFR - Exercício físico de resistência

ADM - Adriamicina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
1.1 OBJETIVOS	5
1.1.1 Objetivos específicos.....	5
1.2 JUSTIFICATIVA	6
2 REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1 GLOMERULOESCLEROSE SEGMENTAR E FOCAL.....	8
2.1.1 Alterações imunológicas na GESF	11
2.2 EXERCÍCIO FÍSICO.....	11
2.2.1 Exercício físico e doenças renais	12
2.2.2 Exercício físico de resistência	13
3 METODOLOGIA	14
3.1 ANIMAIS.....	14
3.2 PROTOCOLO DE EXERCÍCIO FÍSICO DE RESISTÊNCIA	14
3.3 INDUÇÃO DE NEFROPATIA	15
3.4 DESENHO EXPERIMENTAL.....	15
3.4.1 Coleta de urina	15
3.5 EUTANÁSIA	16
3.6 ALBUMINÚRIA.....	16
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	16
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1 MODELO	17
4.1.1 Nefropatia induzida	17
4.1.2 Exercício físico	17
4.2 VARIAÇÃO DE PESO.....	18
4.3 ALBUMINÚRIA.....	21
4.4 PERSPECTIVAS FUTURAS	24
5 CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS.....	26

1 INTRODUÇÃO

O número de pacientes com doença renal crônica (DRC) vem aumentando em todo o mundo e o surgimento da doença está associado com outros quadros crônicos de alta prevalência, como diabetes e hipertensão (ROMÃO JR., 2004).

Aliado ao aumento em sua incidência, queda na qualidade de vida e a alta taxa de reincidência em órgãos transplantados, a Glomeruloesclerose Segmentar e Focal (GESF) é uma das glomerulopatias capazes de levar a um quadro de DRC (BEER; MAYER; KRONBICHLER, 2016), além de ser um importante alvo para pesquisas relacionadas com a saúde pública (MESSINA et al., 2016).

Pacientes com DRC manifestam persistente quadro inflamatório sistêmico, apresentando elevado nível de citocinas envolvidas na resposta inflamatória. Em contrapartida, a prática de exercício vem sendo relacionada com uma ação de modulação de marcadores inflamatórios, sugerindo um efeito anti-inflamatório em resposta aos diferentes tipos de exercício físico (KOUFAKI et al., 2015).

Em conjunto com a inflamação, a DRC leva a uma perda da massa muscular nos pacientes, o que pode agravar o quadro da doença e diminuir sua qualidade de vida. Apesar da possível modulação inflamatória e de levar a um aumento da massa muscular, a prática de exercício físico precisa ser melhor explorada em pacientes com DRC (BARCELLOS et al., 2015).

1.1 OBJETIVOS

Investigar a ação do exercício físico de resistência sobre os mecanismos de lesões renais e seu efeito sobre o quadro de progressão da doença em modelo experimental de glomeruloesclerose.

1.1.1 Objetivos específicos

- Avaliar possíveis alterações do quadro de proteinúria em modelo de nefropatia em resposta ao exercício físico de resistência.
- Analisar a variação de peso dos animais devido a prática de exercício físico de resistência e indução de nefropatia.

1.2 JUSTIFICATIVA

A prevalência de DRC é um problema de saúde pública no Brasil, visto que, no país grande parte dos pacientes sob tratamento dialítico são custeados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (SESSO et al., 2017), sendo a GESF uma doença relacionada com o desenvolvimento de DRC.

Sabe-se que, na GESF, a inflamação persiste de forma sistêmica, o que agrava o estado dos pacientes. Mesmo que as diferentes etiologias e quadros histológicos acarretem em distintos tratamentos para GESF, a prática de exercício físico tem se demonstrado uma possível intervenção ao avanço de doenças renais, visto seu potencial anti-inflamatório (VIANA et al., 2014).

Com este trabalho, pretende-se analisar mecanismos envolvidos na progressão da doença em resposta ao exercício físico de resistência, analisando o quadro de nefropatia e marcadores de lesão renal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

De 10 a 16% da população adulta mundial possuem DRC (DIENEMANN et al., 2016), sendo esta uma doença associada com diabetes, hipertensão e histórico familiar, levando a um aumento dos riscos de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (ROMÃO JR., 2004).

Seu diagnóstico em estágio inicial leva a um atraso na evolução para um quadro de doença renal crônica terminal (DRCT) e está associado com um melhor prognóstico para os pacientes, aumentando sua qualidade de vida e sobrevida (DIENEMANN et al., 2016). O avanço da DRC pode ser classificado em 5 diferentes estágios baseados na taxa de filtração glomerular, e o seu tratamento tem início em casos de pacientes que apresentem estágio de 2 a 5, sendo que a terapia substitutiva é iniciada no estágio 5 da doença (TABELA 1) (ROMÃO JR., 2004 KOUFAKI et al., 2015).

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO E ESTÁGIOS DA DOENÇA RENAL CRÔNICA

Estágio	Filtração Glomerular (ml/min)	Grau de Insuficiência Renal
1	> 90	Presença de Lesão Renal
2	60 – 89	IR Leve ou Funcional
3	30 – 59	IR Moderada
4	15 – 29	IR Severa
5	< 15	IR Terminal

Diferentes estágios de progressão de DRC, suas alterações na taxa de filtração glomerular e sua intensidade. IR: Insuficiência Renal. FONTE: Adaptado de Romão Jr. (2004).

O número de pacientes com DRC vem aumentando, e no Brasil, é estimado que até 2016 haviam 122.825 pacientes com DRC submetidos a tratamento de diálise crônica (SESSO et al., 2017).

Em 2015, 124.111 novos casos de DRCT foram registrados nos Estados Unidos, gerando um custo de \$ 34 bilhões, em conjunto com \$ 64 bilhões gastos para a manutenção desses pacientes com DRC (SARAN et al., 2018).

Dentre as doenças renais que podem levar a um quadro de DRC, observou-se um aumento nos últimos anos na incidência de GESF, sendo que a presença da glomerulopatia associada à síndrome nefrótica está relacionada com a evolução para DRCT em até 50% dos pacientes em um intervalo de até 8 anos após o seu diagnóstico (BEER; MAYER; KRONBICHLER, 2016). A GESF representa um terço

das causas de síndrome nefrótica em adultos e um quarto em crianças havendo a necessidade de transplante renal em 50 a 75% dos casos para pacientes acometidos a mais de 10 anos (PUDUR et al., 2016).

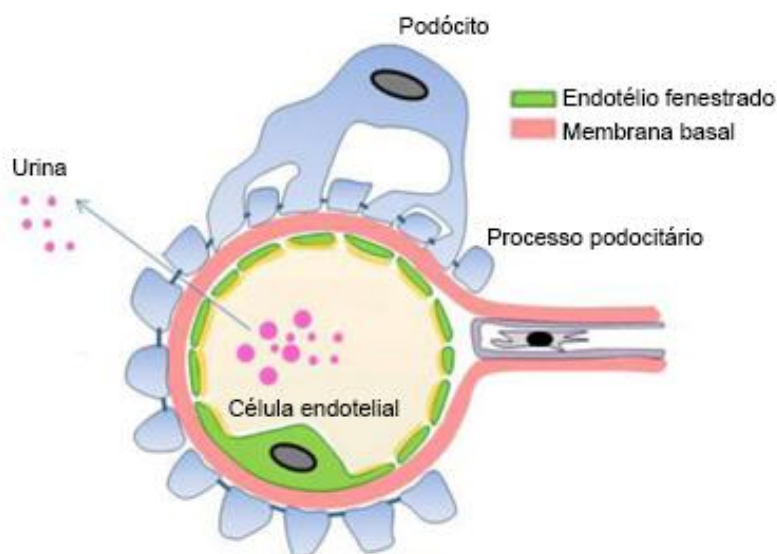
2.1 GLOMERULOESCLEROSE SEGMENTAR E FOCAL

O termo Glomeruloesclerose Segmentar e Focal se refere a um quadro histológico de lesão fibrótica que afeta os rins de maneira focal, não presente em todos os glomérulos, e segmentar, não atingindo todo o tufo glomerular (JEFFERSON; SHANKLAND, 2014).

A GESF primária se caracteriza pela lesão podocitária comumente causada por fatores presentes na circulação ou fatores genéticos e de causa indefinida (FOGO, 2015; JEFFERSON; SHANKLAND, 2014), enquanto a GESF secundária está associada à presença de doenças crônicas e outros fatores, como obesidade, hipertensão, infecções virais e redução da massa renal (LIM et al., 2016).

Podócitos, membrana basal e células do endotélio fenestrado compõem a barreira de filtração glomerular e promovem a filtração seletiva do plasma. A barreira de filtração glomerular (FIGURA 1) permite a passagem de água e de pequenos solutos, mas restringe a passagem da maior parte das proteínas plasmáticas (ARIF; NIHALANI, 2013).

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA BARREIRA DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR



Barreira de filtração glomerular e seus três componentes: Membrana basal glomerular, endotélio fenestrado e podócitos. Fonte: adaptado de ARIF; NIHALANI (2013).

Quadros de proteinúria podem resultar de alteração em qualquer um dos componentes da barreira, mas está principalmente associada, entre outros fatores, com lesão de podócitos (WEN; SHAH; CAMPBELL, 2018). As primeiras manifestações de lesão podocitária encontradas na GESF são, por exemplo, redução do corpo celular e perda dos processos podocitários. A não recuperação celular leva a uma redução do número de podócitos devido morte ou desprendimento dessas células, que, ao deixarem áreas da membrana basal expostas, causam perda da integridade estrutural da barreira de filtração glomerular (JEFFERSON; SHANKLAND, 2014). Essa exposição da membrana basal leva a um processo de adesão entre a membrana basal e a cápsula de Bowman, dando início a um processo de fibrose também chamado de “adesão de tufo”, com consequente evolução até o quadro de fibrose segmentar (FIGURA 2). Esta adesão é a primeira alteração histológica visível em microscopia óptica em biópsias humanas (JEFFERSON; SHANKLAND, 2014; WEN; SHAH; CAMPBELL, 2018).

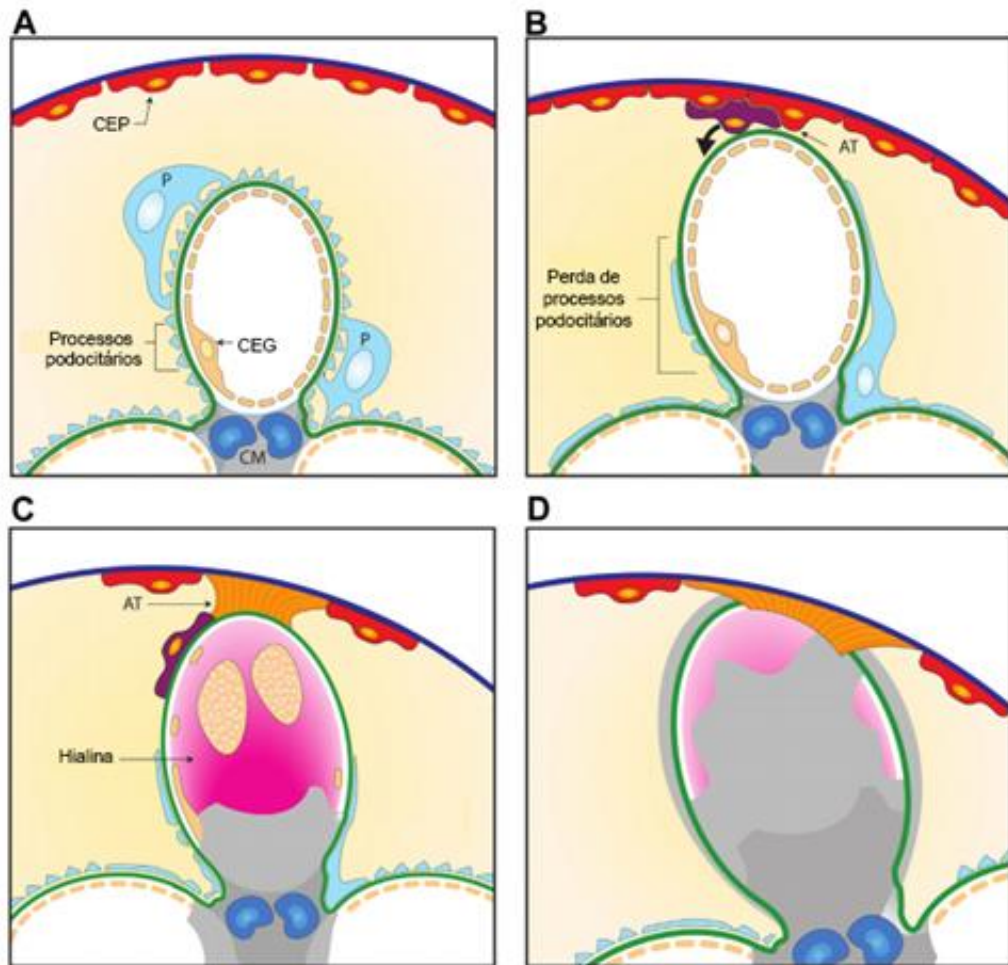
Apesar de acometer indivíduos de qualquer idade, a GESF primária aparenta ser mais comum em adolescentes e jovens adultos. Idiopática, é considerada uma das mais severas glomerulopatias, estando associada com proteinúria, níveis reduzidos de albumina plasmática e hiperlipidemia (MESSINA et al., 2016; ROSENBERG; KOPP, 2017).

A alta taxa de reincidência do quadro (30 a 50%) após transplante renal pode se manifestar por proteinúria grave até mesmo horas após a implantação do novo órgão (MESSINA et al., 2016), sugerindo a presença de um fator circulante necessário para o processo de instalação da lesão (JEFFERSON; SHANKLAND, 2014).

A GESF secundária, ou adaptativa, pode decorrer de diferentes quadros de lesão ao tecido renal. Casos de redução da massa renal, principalmente associada a baixo peso de nascença, ou obesidade podem levar a adaptações na hemodinâmica renal, como hipertensão glomerular ou hiperfiltração, capazes de causar lesão em podócitos e consequente insuficiência renal (KIM et al., 2016).

O uso de drogas também está associado ao desenvolvimento de nefropatias. Estudos com drogas como morfina e heroína tem apontado ação moduladora da proliferação de células e constituintes de podócitos, além de induzir estresse oxidativo em células glomerulares. Alterações em genes de componentes dos processos podocitários, como nefrina (NPHS1) e podocina (NPSH2), podem resultar em um produto não funcional ou ausente, levando à GESF secundária (KIM et al., 2016).

FIGURA 2 - PATOGÊNESE DA GESF



(A) Situação normal glomerular. Células endoteliais glomerular (CEG) e podócitos (P) intactos. Células mesangiais (CM) conferindo sustentação e Células endoteliais parietais (CEP) cobrindo a cápsula de Bowman. (B) Perda de processos podocitários levando a exposição da membrana basal e formação da adesão de tufo (AT). (C) CEPs depositam matriz e garantem característica fibrótica a AT, expansão de CM. (D) Completa formação de fibrose segmentar. FONTE: Adaptado de JEFFERSON; SHACKLAND (2014).

Existem diferentes possíveis tratamentos para GESF, os quais levam em consideração o quadro encontrado na biópsia do tecido renal. Pacientes podem desenvolver formas de lesão suscetíveis ou resistentes à terapia com altas doses de corticosteroides. A resistência à terapia é identificada pela não remissão do quadro de proteinúria após 4 meses de tratamento, e se no período de 2 meses não houver melhora desse quadro para até acima de 20%, a interrupção da terapia deve ser considerada devido efeitos adversos dos medicamentos corticosteroides (SETHI; GLASSOCK; FERVENZA, 2015).

2.1.1 Alterações imunológicas na GESF

A GESF é uma glomerulopatia com quadro de inflamação persistente, onde diversos componentes imunológicos se demonstram alterados, como alterações nos níveis plasmáticos de células T e B, seus produtos e citocinas, como interleucina(IL)-1 β e IL6 (KRONBICHLER et al., 2016). Essas alterações podem levar a uma simultânea imunossupressão e ativação do sistema imune, tornando o paciente suscetível a infecções e com alto risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares pela ocorrência de inflamação crônica (VIANA et al., 2014).

Tanto na GESF como em casos de DRC são encontrados altos níveis de moléculas e células pro-fibróticas. A angiotensina II, atuando em receptores de angiotensina II tipo-I (AT1), leva a um aumento da matriz celular e à lesão de podócitos, assim como TGF- β pode estar diretamente ligado a mecanismos de lesão de podócitos (FOGO, 2015).

Macrófagos estão presentes em diversas glomerulopatias de caráter inflamatório, estando relacionados tanto com a resposta inflamatória quanto fibrótica das doenças (DUFFIELD, 2010, 2011). Na GESF, células espumosas, formadas a partir de macrófagos CD86⁺ estão associadas com a progressão da doença, atuando em mecanismos que levam à síndrome nefrótica (HARA et al., 2015)

2.2 EXERCÍCIO FÍSICO

A prática de exercício físico está associada com uma redução do risco de doenças não infecciosas, como doenças cardiovasculares, doenças caracterizadas por quadro de inflamação crônica e câncer, e infecções virais e bacterianas (CAMPBELL; TURNER, 2018). Tanto durante quanto após a prática de exercício físico, componentes do sistema imunológico apresentam alterações em seus perfis. Apesar da estabelecida melhora na regulação e atividade de componentes do sistema imunológico em resposta a uma prática regular a longo-prazo de exercício físico, os efeitos decorrentes da realização aguda de exercício físico ainda são discutidos (CAMPBELL; TURNER, 2018).

O exercício físico pode promover efeitos modulatórios tanto na resposta imune como na resposta inflamatória. Diferentes tipos de exercícios proporcionam diferentes respostas de ativação e inativação de marcadores para inflamação e imunidade.

Estudos buscando elucidar os efeitos do exercício físico agudo ou intenso tem reportado um aumento da atividade de células NK, aumento de níveis de neutrófilos na circulação em indivíduos jovens e aumento da proliferação de linfócitos e ativação de células T CD8⁺, T CD4⁺ e neutrófilos em indivíduos idosos comparados a indivíduos jovens após a prática de exercício (SELLAMI et al., 2018)

Estudos anteriores demonstraram que pacientes com DRC submetidos a exercício físico agudo apresentaram níveis elevados de IL-6 e IL-10 plasmáticos, enquanto pacientes submetidos a exercício físico moderado durante 6 meses apresentaram baixos níveis de IL-6 e altos níveis plasmáticos de IL-10, entre outros efeitos no perfil de ativação de linfócitos T (VIANA et al., 2014).

Em resposta ao exercício físico moderado, pacientes apresentaram baixa na ativação de linfócitos T e monócitos, sendo que linfócitos T apresentam um padrão de alta ativação crônica e monócitos possuem a característica de alta produção de citocinas pró-inflamatórias em pacientes com DRC (VIANA et al., 2014). Níveis reduzidos de IL-6, citocina pró-inflamatória, e níveis elevados de IL-10 foram reportados, sugerindo ação anti-inflamatória do exercício físico (VIANA et al., 2014).

2.2.1 Exercício físico e doenças renais

Doenças como obesidade e hipertensão vêm apresentando um progressivo aumento em sua prevalência. Junto com as alterações hemodinâmicas decorrentes desses quadros, cresce o número de pacientes com glomerulopatias (HALLAN, 2006).

A prática de atividades físicas já tem sido associada com melhora da qualidade de vida e prevenção DRC (KOUFAKI et al., 2015) e outras doenças crônicas, como distúrbios cardiovasculares, obesidade e diabetes (GLEESON et al., 2011). Pacientes acometidos com DRCT apresentam de 10 a 20 vezes maiores riscos para desenvolvimento de doenças cardiovasculares comparado a indivíduos saudáveis, e, apesar disso, a prática de atividades físicas não tem sido explorada como intervenção em pacientes com DRC como vem sendo recomendada para pacientes com outras doenças crônicas (BARCELLOS et al., 2015).

Um importante fator sobre a mortalidade e morbidade para pacientes com GESF é a perda de massa muscular, sendo causada por, dentre outros fatores, inflamação, estresse oxidativo e inatividade física (WATSON et al., 2015).

Durante a prática de exercício físico ocorre aumento dos níveis de IL-6 circulatórios devido sua liberação por células da musculatura esquelética, sendo que há retomada para os níveis basais cerca de uma hora após a execução do exercício. Em consequência do aumento dos níveis de IL-6, ocorre também a liberação e aumento dos níveis de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, capaz de regular respostas da imunidade adquirida e do processo inflamatório (GLEESON et al., 2011).

Níveis elevados de IL-6 estão associados com aumento da taxa de mortalidade em pacientes com DRC e DRCT associados ou não com complicações cardiovasculares (BARRETO et al., 2010; STENVINKEL et al., 2002).

2.2.2 Exercício físico de resistência

Entre os diferentes tipos de exercício, o exercício físico de resistência (EFR) tem se demonstrado uma boa alternativa para pacientes com DRC, apresentando alta adesão aos programas de treinamento (WATSON et al., 2015).

Dos marcadores que conferem prognóstico ao paciente, a perda de massa muscular em DRC ou DRCT tem sido associada com aumento da mortalidade e morbidade dos pacientes. Em pacientes com DRC em pré-diálise, programas de EFR tem demonstrado ganho de massa muscular (WATSON et al., 2015, 2017).

Além da redução nos níveis de citocinas inflamatórias que indicam ação anti-inflamatória sistêmica (CASTANEDA et al., 2004; WATSON et al., 2017), a prática de EFR atua no estresse oxidativo conferindo regulação sobre a produção de superóxidos e melhora do sistema antioxidante em células da musculatura, melhorando a cadeia respiratória de mitocôndrias (SCHEFFER et al., 2012).

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Para este projeto foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos da linhagem *Swiss*, provenientes do Biotério Central do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos no biotério em caixas coletivas, com cinco animais cada, em ciclo artificial de claro/escuro de 12 horas, com temperatura controlada de 20°C e suprimento de água e alimento *ad libitum*.

Os procedimentos foram realizados de acordo com a lei federal 11.794 de 08 de outubro de 2008, com a regulamentação do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal e aprovação pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), sob o número 1184.

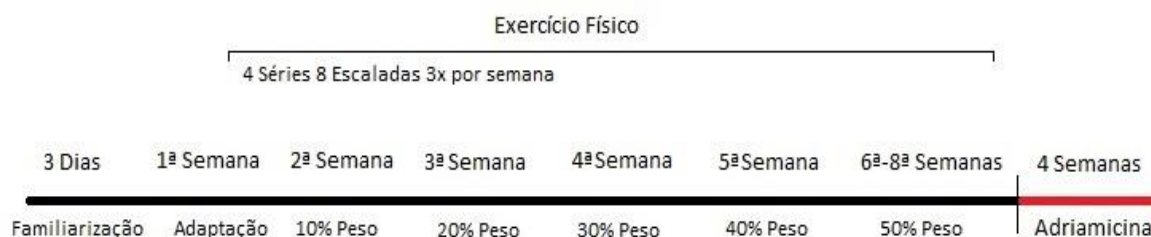
3.2 PROTOCOLO DE EXERCÍCIO FÍSICO DE RESISTÊNCIA

Foi utilizada uma escada vertical com 110 cm de altura, 18 cm de largura e degraus espaçados em 2 cm, conforme modelo descrito na literatura (HORNBERGER JR.; FARRAR, 2004), com uma caixa de 20x20x20 cm no topo para o repouso dos animais entre as escaladas.

Os animais passaram por um período de familiarização, sendo auxiliados em sua subida a partir de diferentes pontos da escada (35 cm, 55 cm e 110 cm) seguido de um período de adaptação que consistiu de 4 séries de 8 subidas sem a utilização de pesos (PEDROSO et al., 2017).

No protocolo de exercício físico de resistência, os animais chegaram a uma carga máxima de 50% de sua massa corporal, que aumentou de forma progressiva durante o decorrer do experimento, partido de 10% de sua massa corporal, com adição de 10 % do peso corporal a cada semana. Ao chegar ao topo da escada, os animais tiveram dois minutos de descanso entre cada repetição. O protocolo teve duração de 8 semanas, sendo realizado 3 vezes por semana em dias não consecutivos.

FIGURA 3 – PROTOCOLO DE EXERCÍCIO FÍSICO DE RESISTÊNCIA



3.3 INDUÇÃO DE NEFROPATIA

Foi utilizado o modelo adaptado de glomeruloesclerose segmentar e focal por nefropatia induzida por adriamicina (ADM) (LEE; HARRIS, 2011; OKUDA et al., 1986). Para o modelo, foi utilizado adriamicina (Adriblastina®) da marca Pfizer (Pfizer™, Inc. Nova Iorque, USA).

Os animais receberam dose única de ADM de 10 mg/kg, por via intravenosa na veia caudal.

3.4 DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos nos seguintes grupos: 1) Grupo Sedentário, 2) Grupo Sedentário + ADM, 3) Grupo Exercício Físico, 4) Grupo Exercício Físico + ADM.

Os grupos 3 e 4 fizeram três sessões de exercício por semana, durante 8 semanas, enquanto os grupos 1 e 2 foram mantidos em caixas de dimensões iguais aos grupos de exercício, para simular o estresse.

Ao fim do protocolo de 8 semanas de treinamento foi induzido o modelo de nefropatia via ADM nos grupos 2 e 4. A eutanásia dos animais ocorreu após 28 dias da administração de ADM.

3.4.1 Coleta de urina

Para posterior análise de albuminúria a urina dos animais foi coletada no período de 0 (basal), 7 dias, 10 dias, 14 dias, 21 dias e 28 dias após a administração de ADM.

3.5 EUTANÁSIA

A eutanásia dos animais ocorreu após anestesia prévia utilizando solução de xilasina e cetamina (16 mg/kg e 150mg/kg, respectivamente) por via intraperitoneal. Foi realizada a coleta de sangue, via punção cardíaca. Os rins foram coletados e descapsulados, sendo que o rim esquerdo foi armazenado em solução formol, dividido em duas metades por um corte longitudinal, e o rim direito cortado transversalmente em pequenos pedaços, sendo então depositados em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em freezer a -80°C.

3.6 ALBUMINÚRIA

Foi realizada uma estimativa da albuminúria via eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10%. Foi adicionado o agente redutor de pontes dissulfeto β -mercaptoetanol. O gel foi corado com Azul de Coomassie e a quantificação da albuminúria realizada utilizando o fotodocumentador modelo Amersham Imager 600 da General Electric®.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa GraphPad Prism® 6 (GraphPad Software, San Diego, California – EUA. Para a comparação de mais de 2 grupos, foi realizado análise de variância ANOVA unicaudal. Em casos de diferença os grupos foram comparados entre si com teste de comparação de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MODELO

4.1.1 Nefropatia induzida

O modelo de indução de nefropatia por adriamicina apesar de muito usado e apresentar alta reprodutibilidade, possui variações de sua resposta de acordo com o modelo animal utilizado. A administração de uma dose correta é o ponto-chave para o sucesso do modelo e desenvolvimento da lesão no tecido renal, possuindo como variáveis a espécie, linhagem, sexo e idade dos animais (LEE; HARRIS, 2011).

Utilizado tanto em ratos como em camundongos, a dose para camundongos da linhagem BALB/c varia entre 9.8-10.4 mg/kg, enquanto a linhagem C57BL/c apresenta resistência a lesão causada por adriamicina, sendo administradas doses que variam de 13-25 mg/kg (LEE; HARRIS, 2011).

Para camundongos da linhagem *Swiss*, foi observado uma resposta a administração do quimioterápico nas doses de 10 mg/kg e 25 mg/kg, sendo necessário um intervalo de 14 dias para uma acentuação dos marcadores da lesão para a dose de 10 mg/kg, enquanto apenas 5 dias levam a quadros elevados de proteinúria e lesão histológica utilizando a dose de 25 mg/kg (SANTOS, 2018).

Em nossos experimentos utilizamos camundongos da linhagem *Swiss*, sendo administrado ADM na dose de 10 mg/kg. A coleta de dados de resposta dos animais frente a administração de ADM ocorreu durante o período de 28 dias, onde observamos diferentes níveis de albuminúria e variação do peso corporal dos animais dos diferentes grupos.

4.1.2 Exercício físico

Com o crescente interesse nos efeitos e entendimento sobre a ação da prática de exercício físico em diferentes doenças, diversos métodos têm sido propostos e utilizados como modelo experimental para simular os diferentes tipos de exercício físico, entre eles, o de exercício físico de resistência. Apesar do aumento do número de estudos realizados utilizando o modelo de escalada vertical, por sua similaridade no desenvolvimento da força muscular e outros aspectos entre humanos e o modelo,

uma padronização em seus parâmetros, tais como adaptação, familiarização, carga e intensidade do treino, ainda se faz necessária (NETO, 2016).

Assim como o modelo de nefropatia, a escalada vertical é utilizada como modelo de EFR para ratos e camundongos (PEDROSO et al., 2017; SOUZA et al., 2018).

Modelos que visam performance máxima dos animais utilizam cargas superiores às submetidas neste estudo. Para estabelecer a carga máxima de treino, um teste de repetição máxima é aplicado ao animal. Hornberger e Farrar (2004) descreveram o primeiro modelo do teste, onde, partindo de 75% do peso corporal, ratos recebiam uma carga adicional de 30 g até não conseguirem escalar completamente o equipamento, mesmo após estímulos elétricos na cauda do animal. As sessões de treinamento seguintes utilizariam cargas percentuais progressivas da carga estabelecida no teste de carga máxima.

Em nosso estudo, onde o interesse era a avaliação do EFR de carga moderada, os animais partiram de uma ausência de carga (0% de seu peso corporal) até uma carga máxima de 50% ao longo das 8 semanas do protocolo de exercício.

4.2 VARIAÇÃO DE PESO

Durante todo o experimento foi realizada pesagem dos animais em intervalos de 7 dias para avaliar a variação do peso corporal decorrente da administração de ADM (PEREIRA et al., 2011). Os dados da média de peso corporal dos animais no período de início do protocolo de exercício (basal), momento de administração de ADM e eutanásia estão representados na TABELA 2.

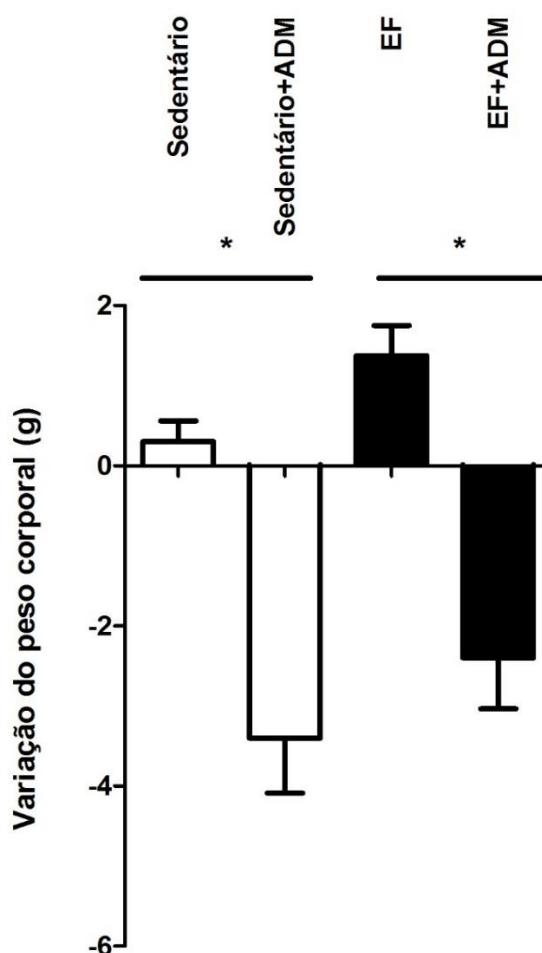
TABELA 2 – PESO CORPORAL MÉDIO DOS ANIMAIS

Grupo	Basal (g)	Administração de ADM (g)	Eutanásia (g)
Sedentário	22.8 ± 0.88	40.1 ± 1.06	42.2 ± 1.39
Sedentário + ADM	23.3 ± 0.67	40.3 ± 0.63	38.3 ± 0.67
Exercício	21.5 ± 0.43	36.4 ± 0.60	38.8 ± 1.05
Exercício + ADM	24.5 ± 0.45	37.4 ± 0.69	38.7 ± 0.68

Peso corporal médio dos animais nos períodos Basal (anterior ao protocolo de EFR), Administração de ADM (ao final do protocolo de EFR) e Eutanásia. No período Basal nenhum grupo havia recebido ADM. Média ± EPM.

Observamos no período de 14 dias após a administração de ADM (FIGURA 4) uma redução do peso corporal dos animais que receberam a droga, indicando ação da ADM nesses animais. Devido a prática de exercício físico, os animais dos grupos EF e EF + ADM apresentaram reduzido aumento do peso ao longo das 8 semanas de protocolo experimental decorrente de seu crescimento natural, indicado pela tendência de um maior aumento do peso corporal dos animais do grupo EF em comparação com o grupo Sedentário após o fim do protocolo de EFR e administração de ADM nos devidos grupos.

FIGURA 4 – VARIAÇÃO DO PESO CORPORAL DOS ANIMAIS NO PERÍODO DE 14 DIAS APÓS ADMINISTRAÇÃO DE ADM.

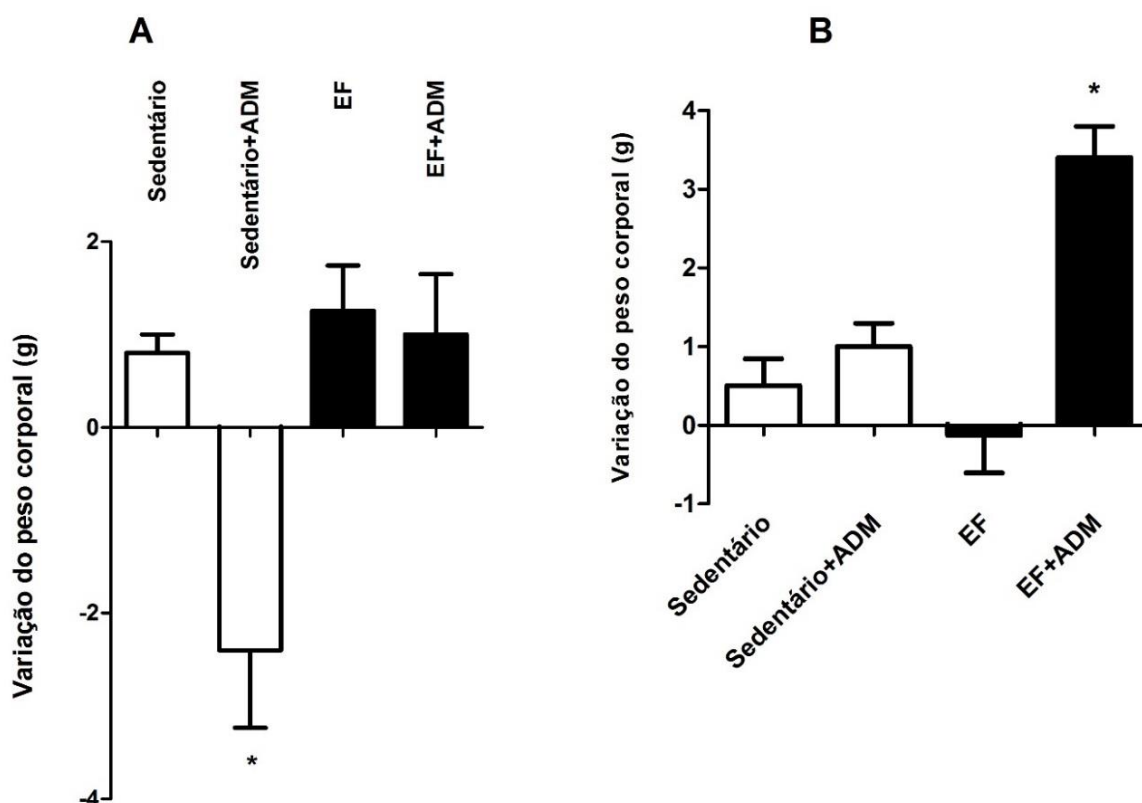


No período de 14 dias após a administração de ADM foi observado redução do peso corporal dos animais em resposta a ADM, não sendo encontrada diferença estatística entre os grupos que receberam ADM (Sedentário+ADM e EF+ADM) ou entre os grupos que não receberam a droga (Sedentário e EF). Média \pm EPM, $p < 0.05$. $n = 10$.

No período de 21 dias após a administração de ADM (FIGURA 5A) percebemos ainda uma redução do peso corporal dos animais do grupo Sedentário + ADM, ao passo que uma tendência da recuperação de peso corporal dos animais do grupo EF + ADM foi observada. Quando comparadas as variações de peso entre os dias 14 e 21 da administração de ADM (FIGURA 5B) observamos um aumento do peso corporal dos animais do grupo EF + ADM, indicando uma possível ação do exercício físico na progressão da nefropatia induzida a partir deste ponto.

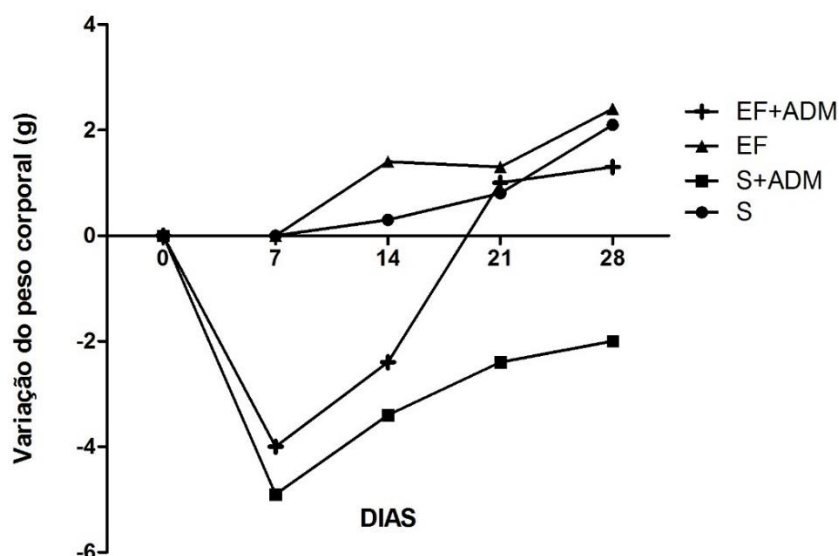
O período de maior variação do peso corporal dos animais ocorreu 7 dias após a administração de ADM (FIGURA 6), sendo observada progressiva recuperação dos animais nos períodos subsequentes para os animais tratados com ADM e um aumento do peso corporal dos animais que não receberam a droga.

FIGURA 4 – VARIAÇÃO DO PESO CORPORAL DOS ANIMAIS NO PERÍODO DE 21 DIAS.



(A) Variação de peso corporal 21 dias após a administração de ADM. (B) Variação do peso corporal entre o período de 14 dias e 21 dias da administração de ADM. Média \pm EPM, * $p < 0.05$ vs todos os grupos. $n = 10$.

FIGURA 5 - VARIAÇÃO DO PESO CORPORAL DOS ANIMAIS APÓS ADMINISTRAÇÃO DE ADM.



Variação do peso dos animais (g) ao longo de 28 dias após a administração de adriamicina (ADM). n = 10.

Os resultados da variação de peso dos animais indicam ação da ADM induzindo uma perda de peso, que se encontra acentuada no período de 7 dias após a administração e que apresenta aparente recuperação ao decorrer das semanas. A prática de EFR apresentou algumas alterações no perfil de aumento de peso dos animais, sendo observada significativa recuperação desse parâmetro nos animais no período entre 14 e 21 dias da administração da droga.

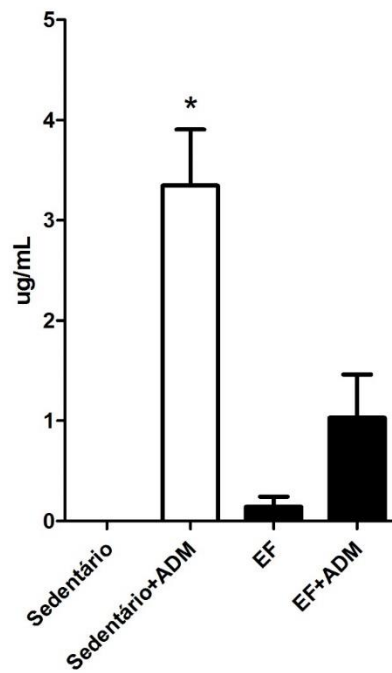
4.3 ALBUMINÚRIA

No período de 14 dias após a administração de ADM observamos um aumento no quadro de proteinúria dos animais (FIGURA 7).

De acordo com o modelo experimental de nefropatia induzida, a dose de 10 mg/kg de ADM leva a um quadro de proteinúria detectável no período de 14 dias (SANTOS, 2018).

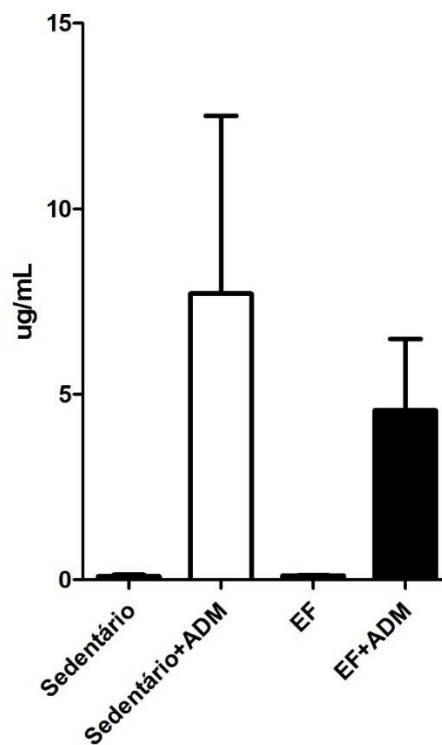
Observamos a instalação de um quadro de maior intensidade de proteinúria nos animais não treinados e que receberam injeção de ADM (Sedentário + ADM), sendo que os animais submetidos ao treino de EFR apresentaram uma tendência de diminuição do quadro de proteinúria, porém sem apresentar significância estatística.

FIGURA 6 – AVALIAÇÃO DA ALBUMINÚRIA NO PERÍODO DE 14 DIAS.



Estimativa do quadro de albuminúria em um período de 14 dias após a administração de adriamicina. Média \pm EPM, * $p < 0.05$ vs todos os grupos, $n=4$.

FIGURA 7 – AVALIAÇÃO DO QUADRO DE ALBUMINÚRIA NO PERÍODO DE 21 DIAS.



Estimativa do quadro de proteinúria no período de 21 dias após a administração de ADM Média \pm EPM, $p < 0.05$. $n=4$.

Para o período de 21 dias (FIGURA 8) observamos uma tendência do aumento da albuminúria dos animais que receberam ADM. Análises estatísticas não demonstraram diferenças entre os grupos Sedentário + ADM e EF + ADM, não indicando uma ação moduladora do exercício físico sobre a progressão da nefropatia.

Deste modo, confirmamos os dados descritos por Santos, 2018, onde a dose de ADM 10 mg/kg levou a um quadro acentuado de proteinúria dos animais no período de 14 dias.

Porém, os possíveis efeitos do exercício físico por sua estimada atuação em níveis de citocinas e células envolvidas no processo inflamatório (WATSON et al., 2017) que atuariam no mecanismo de progressão de nefropatia não apresentaram alteração nos níveis de proteinúria.

Pacientes em processo de pré-diálise e submetidos a um programa de exercício físico de intensidade moderada e regular apresentaram uma modulação em componentes do sistema inflamatório, como redução dos níveis de IL-6, aumento dos níveis de IL-10 e diminuição dos níveis de ativação de Linfócito T, sem alterar o quadro de proteinúria e perda de peso corporal decorrentes da presença de DRC nesses pacientes (VIANA et al., 2014).

Em seus estudos, em um modelo de DRC por nefrectomia em ratos, que resulta em um aumento dos níveis de proteína encontrados na urina, Souza *et al.* (2018) observaram que o EFR levou a uma redução do quadro de fibrose no tecido renal dos animais submetidos ao exercício físico e que haviam passado pelo processo de nefrectomia quando comparado aos animais que não foram submetidos a prática de exercício.

Ainda no mesmo estudo, foi observado um aumento das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 no tecido renal após o protocolo de EFR, de mesma forma que os níveis de citocina pró-inflamatória IL-6 se encontraram reduzidos. (SOUZA et al., 2018).

Desta forma, apesar da ausência de diferenças para proteinúria, análises histológicas e de outros marcadores como citocinas devem ser realizados para indicar se o exercício físico de resistência moderado exerce efeito sobre a progressão da nefropatia.

4.4 PERSPECTIVAS FUTURAS

Para reforçar os dados obtidos no presente estudo pretendemos dar continuidade com a análise dos níveis séricos de citocinas envolvidas no processo de inflamação, como IL-6, IL-4, IL-10 e IL-13, realizar análise histológica e microscopia eletrônica para quantificar os níveis de fibrose, necrose e infiltrado de células inflamatórias no tecido renal dos animais, além de avaliar esses marcadores no tecido muscular e aumentar o número amostral de nossos experimentos.

5 CONCLUSÃO

Apesar da limitação quanto aos dados referentes a albuminúria, foi observada uma tendência de redução desse marcador em resposta ao EFR, assim como uma possível melhora no peso corporal dos animais.

Conforme discutido, possíveis alterações no modelo de EFR e indução de nefropatia por ADM podem levar a diferentes resultados. Os dados aqui apresentados poderão ser utilizados para estabelecer um melhor modelo para pesquisas futuras, utilizando diferentes doses, cargas e momentos de indução da nefropatia.

REFERÊNCIAS

ARIF, E.; NIHALANI, D. Glomerular Filtration Barrier Assembly: An insight. **Postdoc Journal**, 21 abr. 2013.

BARCELLOS, F. C. et al. Effects of exercise in the whole spectrum of chronic kidney disease: a systematic review. **Clinical Kidney Journal**, v. 8, n. 6, p. 753–765, dez. 2015.

BARRETO, D. V. et al. Plasma interleukin-6 is independently associated with mortality in both hemodialysis and pre-dialysis patients with chronic kidney disease. **Kidney International**, v. 77, n. 6, p. 550–556, mar. 2010.

BEER, A.; MAYER, G.; KRONBICHLER, A. Treatment Strategies of Adult Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis: A Systematic Review Focusing on the Last Two Decades. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–9, 2016.

CAMPBELL, J. P.; TURNER, J. E. Debunking the Myth of Exercise-Induced Immune Suppression: Redefining the Impact of Exercise on Immunological Health Across the Lifespan. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 16 abr. 2018.

CASTANEDA, C. et al. Resistance training to reduce the malnutrition-inflammation complex syndrome of chronic kidney disease. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 43, n. 4, p. 607–616, abr. 2004.

DIENEMANN, T. et al. International Network of Chronic Kidney Disease cohort studies (iNET-CKD): a global network of chronic kidney disease cohorts. **BMC Nephrology**, v. 17, n. 1, 2 set. 2016.

DUFFIELD, J. S. Macrophages and Immunologic Inflammation of the Kidney. **Seminars in Nephrology**, v. 30, n. 3, p. 234–254, maio 2010.

DUFFIELD, J. S. Macrophages in Kidney Repair and Regeneration. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 22, n. 2, p. 199–201, 1 fev. 2011.

FOGO, A. B. Causes and pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis. **Nature Reviews Nephrology**, v. 11, n. 2, p. 76–87, fev. 2015.

GLEESON, M. et al. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 9, p. 607–615, set. 2011.

HALLAN, S. I. International Comparison of the Relationship of Chronic Kidney Disease Prevalence and ESRD Risk. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 17, n. 8, p. 2275–2284, 1 ago. 2006.

HARA, S. et al. Podocyte Injury–Driven Lipid Peroxidation Accelerates the Infiltration of Glomerular Foam Cells in Focal Segmental Glomerulosclerosis. **The American Journal of Pathology**, v. 185, n. 8, p. 2118–2131, ago. 2015.

HORNBERGER JR., T. A.; FARRAR, R. P. Physiological Hypertrophy of the FHL Muscle Following 8 Weeks of Progressive Resistance Exercise in the Rat. **Canadian Journal of Applied Physiology**, v. 29, n. 1, p. 16–31, fev. 2004.

JEFFERSON, J. A.; SHANKLAND, S. J. The Pathogenesis of Focal Segmental Glomerulosclerosis. **Advances in chronic kidney disease**, v. 21, n. 5, p. 408–416, set. 2014.

JUNIOR, J. E. R. Doença Renal Crônica: Definição, Epidemiologia e Classificação. p. 3, [s.d.].

KIM, J. S. et al. Secondary Focal Segmental Glomerulosclerosis: From Podocyte Injury to Glomerulosclerosis. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–7, 2016.

KOUFAKI, P. et al. The BASES expert statement on exercise therapy for people with chronic kidney disease. **Journal of Sports Sciences**, v. 33, n. 18, p. 1902–1907, 8 nov. 2015.

KRONBICHLER, A. et al. Immunologic Changes Implicated in the Pathogenesis of Focal Segmental Glomerulosclerosis. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–5, 2016.

LEE, V. W.; HARRIS, D. C. Adriamycin nephropathy: A model of focal segmental glomerulosclerosis: Adriamycin nephropathy. **Nephrology**, v. 16, n. 1, p. 30–38, jan. 2011.

LIM, B. J. et al. Pathogenesis of Focal Segmental Glomerulosclerosis. **Journal of Pathology and Translational Medicine**, v. 50, n. 6, p. 405–410, 15 nov. 2016.

MESSINA, M. et al. Update on the treatment of focal segmental glomerulosclerosis in renal transplantation. **World Journal of Transplantation**, v. 6, n. 1, p. 54, 2016.

NETO, W. K. Vertical Climbing for Rodent Resistance Training: a Discussion about Training Parameters. **International Journal of Sports Science**, p. 14, 2016.

OKUDA, S. et al. Adriamycin-induced nephropathy as a model of chronic progressive glomerular disease. **Kidney International**, v. 29, n. 2, p. 502–510, fev. 1986.

PEDROSO, J. A. B. et al. SOCS3 expression in SF1 cells regulates adrenal differentiation and exercise performance. **Journal of Endocrinology**, v. 235, n. 3, p. 207–222, dez. 2017.

PEREIRA, R. L. et al. Bradykinin receptor 1 activation exacerbates experimental focal and segmental glomerulosclerosis. **Kidney International**, v. 79, n. 11, p. 1217–1227, jun. 2011.

PUDUR, S. et al. Serum glomerular albumin permeability activity: association with rapid progression to end-stage renal disease in focal segmental glomerulosclerosis. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, dez. 2016.

ROSENBERG, A. Z.; KOPP, J. B. Focal Segmental Glomerulosclerosis. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 12, n. 3, p. 502–517, 7 mar. 2017.

SANTOS, T. C. O. **O papel da sinalização STAT-3 nas lesões renais associadas à nefropatia induzida por adriamicina em camundongos heterogêneos.** Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018

SARAN, R. et al. US Renal Data System 2017 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 71, n. 3, p. A7, mar. 2018.

SCHEFFER, D. L. et al. Impact of different resistance training protocols on muscular oxidative stress parameters. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 37, n. 6, p. 1239–1246, dez. 2012.

SELLAMI, M. et al. Effects of Acute and Chronic Exercise on Immunological Parameters in the Elderly Aged: Can Physical Activity Counteract the Effects of Aging? **Frontiers in Immunology**, v. 9, 10 out. 2018.

SESSO, R. C. et al. Brazilian Chronic Dialysis Survey 2016. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 39, n. 3, 2017.

SETHI, S.; GLASSOCK, R. J.; FERVENZA, F. C. Focal segmental glomerulosclerosis: towards a better understanding for the practicing nephrologist. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 30, n. 3, p. 375–384, 1 mar. 2015.

SOUZA, M. K. et al. Resistance training attenuates inflammation and the progression of renal fibrosis in chronic renal disease. **Life Sciences**, v. 206, p. 93–97, ago. 2018.

STENVINKEL, P. et al. Mortality, malnutrition, and atherosclerosis in ESRD: What is the role of interleukin-6? **Kidney International**, v. 61, p. S103–S108, maio 2002.

VIANA, J. L. et al. Evidence for Anti-Inflammatory Effects of Exercise in CKD. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 25, n. 9, p. 2121–2130, 1 set. 2014.

WATSON, E. L. et al. Progressive Resistance Exercise Training in CKD: A Feasibility Study. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 66, n. 2, p. 249–257, ago. 2015.

WATSON, E. L. et al. The Effect of Resistance Exercise on Inflammatory and Myogenic Markers in Patients with Chronic Kidney Disease. **Frontiers in Physiology**, v. 8, 28 jul. 2017.

WEN, Y.; SHAH, S.; CAMPBELL, K. N. Molecular Mechanisms of Proteinuria in Focal Segmental Glomerulosclerosis. **Frontiers in Medicine**, v. 5, 16 abr. 2018.